

図5 *S mutans* MT8148 株滴下によるエナメル質の硬度変化

人工口腔装置による検討(2) GTF阻害作用をもつホリフェノール(HBT)の人工口腔装置における人工ハイオフィルム形成とエナメル質脱灰に及ぼす影響を調べた。1%スクロースを対照側とし、1%スクロース+0.02% HBT を実験側として HI 培地 *S sobrinus* 6715 株菌体懸濁液とともに連続的に滴下した。図6から分かるように対照側では滴下8時間くらいから pH が低下し始め 10時間で pH5.5、16時間で pH4.3 となった。一方 実験側では pH 低下は遅延し、10時間くらいから低下し始め 14時間で pH5.5 16時間で pH5.2 であった。

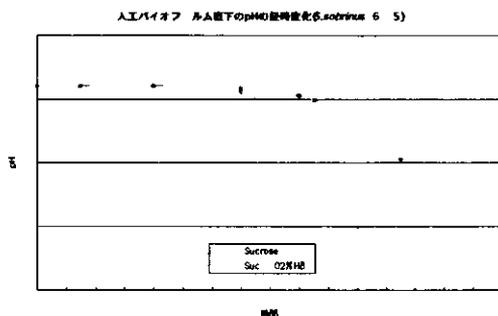


図6 人工ハイオフィルム直下の pH の経時変化

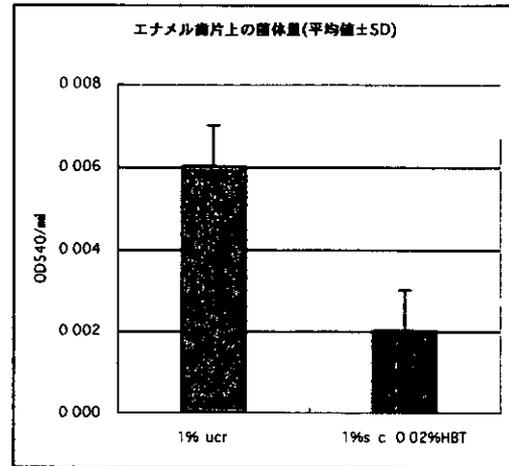


図7 エナメル質歯片上の人工ハイオフィルム量 (菌体量)

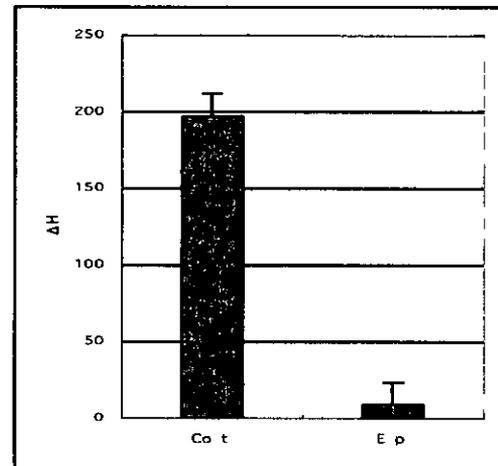


図8 エナメル質脱灰度

また エナメル質の硬度変化 ( $\Delta H$ ) で表した脱灰度は対照側に比べて実験側で有意に低かった (図8) このように 少なくとも用いた条件下でホリフェノールはスクロースと共存しても人工ハイオフィルム形成を阻害し、そのためにバイオフィルム直下の pH 低下を阻害し、エナメル質の脱灰を抑制していることか分かった

#### D 考察

本研究で構築した人工口腔装置はう蝕誘発に係わる3つのパラメーター (ハイオフィルム形成 pH 低下 エ

ナメル質脱灰)を同時に定量的に測定できるように設計された装置である。中央部の人工口腔部分と周辺部(pHレコーダ、送液ポンプ、恒温槽、冷却攪拌器)から構成されていて、全体的に比較的簡単なシステムではあるか。ミュータンスレンサ球菌のもつう蝕原性の主要な要因である非水溶性グルカン合成能と糖質からの有機酸の産生能を評価できるシステムと考えられる。S mutans または S sobrinus 懸濁液をスクロース培地と共に電極面に滴下することにより、ミュータンスレンサ球菌のもつグルカン合成酵素(GTF)により徐々に人工ハイオフィームが形成され、それに伴ってバイオフィーム直下では糖質の発酵によってつくられる有機酸によりpH低下が起こる。本装置の長所は、このpH変化を連続的にモニターできることである。また、電極周辺にエナメル質歯片を装着すると、歯片上にも人工バイオフィームが形成されてpHの低下が起こると考えられる。歯片上に形成された人工ハイオフィーム直下のpH変化は直接測定することができないが、電極と歯片が同一のトーム様液滴の中に存在する微小環境下では歯片上でも電極面と同様のpH変化が起こっていると想定される。このことは、電極面と歯片の単位面積当りの人工バイオフィーム量が近似していることから類推される。人工ハイオフィーム量は500nmの濁度で測定した菌体量と、フェノール硫酸法で測定した非水溶性グルカン量とで表すことができる。そして、エナメル質の脱灰度を実験前後の歯片の硬度差から知ることができる。

この一連の過程が再現性よく起こっていることは、2台の人工口腔を同一条件で稼働したときに、ほぼ同様のpH低下曲線を示すことから裏付けられる。現在は、2台の人工口腔を用いて検討

しているが、できれば3台の人工口腔を同時に稼働すれば、1台をスクロース滴下の対照側とし、もう2台を実験側とすることか可能となる。代用甘味料やそれを含有する食品のう蝕原性を検討するような場合、1台をスクロースの対照側とし、もう2台で比較検討することができる。

本実験で検討した代用甘味料候補のキシロリフルクトンド(XF)は、人工口腔装置による検討で、XF単独ではpH低下もきたさず、エナメル質脱灰も起こさず、少なくとも用いた条件下では、極めてう蝕を誘発しにくい糖質であることかすでに示唆されている。本実験で観察された様に、XFはスクロースと共存しても条件によってはスクロースのもつう蝕原性をある程度抑制する可能性か示唆された。

また、やはりGTF阻害剤として知られているポリフェノールも、スクロースとの共存下でも人工ハイオフィーム形成量、ハイオフィーム直下のpH低下、エナメル質の脱灰を抑えることか示された。本人工口腔装置は種々の糖質のう蝕誘発性だけでなく多くの物質の抗う蝕誘発性も評価できる可能性か示唆されたと考えられる。しかし、それを結論つけるにはなお検討の余地かある。

食品素材あるいはそれを含有する食品のう蝕原性を評価するための方法には、in vitro および in vivo のいくつかの方法があるが、それらにはそれぞれ長所と短所かあり、単独の方法でう蝕原性を評価することは今のところ難しいので、いくつかの方法を組み合わせる方法かとられている。現在、特定保健用食品の認可に際しガイドラインか適用されているのはガムとキャンデーだけである。単に非う蝕原性というだけでなく、再石灰化能をもった食品もすでに特定保健用食品として許可され

市販されている。将来的には人工口腔装置による再石灰化能の評価系の確立が必要になることも考えられる。今のところ動物試験やヒト被験者での in vivo の方法を凌ぐ in vitro の方法が存在しないのが現状である。in vivo の方法には倫理的、時間的 経済的制約があり 汎用評価系とするには限界がある。そこでできるだけ in vivo の結果を反映できるような in vitro の評価系の確立が待たれる。

## E 結論

う蝕原性細菌によるう蝕誘発に深い関わりをもつ3つのハラメーター（人工ハイオフィルム量 ハイオフィルム下 pH エナメル質脱灰度）を同時に測定できる人工口腔装置を構築し 糖質のう蝕誘発性やグルカン合成酵素阻害剤のエナメル質脱灰抑制作用について検討した。その結果 本装置の評価システムとしての有用性が示唆された。

## F 健康危険情報

特になし。

## G 研究発表

### 1 論文発表

1 H Kamasaka D Inaba, K Minami, K To-o T Nishimura T Kuriki, S Imai, N Hanada and M Yonemitsu Application of phosphoryl oligosaccharides of calcium (Pos-Ca) for oral health (in press)

2 Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human b-defensin-2 Antimicrobial Effects of hBD-2 on Oral Streptococci Nishimura E Eto A, Kato M Hashizume S, Imai S, Nisizawa T

and Hanada N Current Microbiology, (in press)

3 RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanicity of peptide antigens in intranasal immunization Yano A, Onozuka A, Matin K Imai S, Hanada N, Nisizawa T *Vaccine* 22 237-243, 2003

4 D, Inaba, K, Minami, H Kamasaka, T, Kuriki, S, Imai and M Yonemitsu Intraoral Effects of Phosphoryl-Oligosaccharide Calcium on Remineralization of Enamel Lesions, *J Dent Health*, 53 8-12, 2003

5 今井 奨 キンリトールなどの効果は？ *日本歯科評論* 63(9), 13-15 2003

6 今井 奨 あなたの質問に答えませ (No 11) *歯科衛生士* Vol 27, 72-73 2003

7 今井 奨 あなたの質問に答えませ (No 14) *歯科衛生士* Vol 28, 84-85, 2003

### 2 学会発表

1 S IMAI, M MATSUNAGA, M TAGASHIRA T KANDA, T NISIZAWA, and N HANADA Inhibitory Effect of Hop Bract Polyphenols against Artificial Biofilm Formation and Enamel Demineralization by Mutans Streptococci 81st General Session of the International Association for Dental Research, June, 2003 Goteborg, Sweden

2 K MINAMI D INABA H KAMASAKA S IMAI and M YONEMITSU Intra-oral Effect of Phosphoryl-Oligosaccharide Calcium (POs-Ca) on

Remineralization of Enamel and Dentin 81st General Session of the International Association for Dental Research, June, 2003, Goteborg, Sweden

3 H KAMASAKA D INABA, K MINAMI, Y KUROKI, K TO-O, T NISHIMURA, T KURIKI S IMAI and M YONEMITSU Assessment of Enamel Remineralization Using Whole Saliva Collected from Children by Chewing Gum Containing Calcium Salt of Phosphoryl-Oligosaccharides (POs-Ca) 81st General Session of the International Association for Dental Research, June 2003, Goteborg Sweden

4 今井 奨 ノンホノウム 口腔保健における臨床検査技術の最前線 う蝕臨床検査技術の現状と問題点 第52回日本口腔衛生学会総会 2003年9月 北九州市。

5 薄井由枝 今井 奨 樋出守世 西沢俊樹 花田信弘 植松 宏 Actinomyces viscosus と Actinomyces naeslundiiによる象牙質脱灰の経時的変化に関する基礎的研究 第52回日本口腔衛生学会総会 2003年9月、北九州市

6 鴨田剛司 今井敏夫 左藤 勉 樋出守世 西沢俊樹 今井 奨 花田信弘 人工口腔装置における *S mutans*および *S sobrinus*のう蝕原性要因の比較 第52回日本口腔衛生学会総会、2003年9月 北九州市。

7 T ARAI, A HAYASHIDA, K

HOSHI A NAWASHIRO M KISHI, S IMAI, N HANADA, and K KAMOI Relationship between Oral Malodor and Clinical States of Periodontal Disease 82<sup>nd</sup> General Session of the International Association for Dental Research, March 2004, Honolulu, USA

8 A HAYASHIDA, K HOSHI, Y SATO, J ITO, T ARAI, S IMAI, N HANADA and H UEMATSU Analyzing the Gases in Breath Odor with an Electronic Nose 82<sup>nd</sup> General Session of the International Association for Dental Research, March 2004, Honolulu, USA

9 K MATIN S IMAI H TAKEUCHI, M URAGUCHI N HANADA, and J TAGAMI Biofilm Adherence to Implant Materials Formed in an Artificial Mouth 82<sup>nd</sup> General Session of the International Association for Dental Research March 2004, Honolulu USA

10 Y USUI, S IMAI, N HANADA and H UEMATSU Comparison of Root Cariogenic Bacteria in Artificial Mouth System 82<sup>nd</sup> General Session of the International Association for Dental Research March 2004 Honolulu, USA

H 知的財産権の出願 登録状況 特になし。

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

- I 高齢者舌苔中ミュータンスレンサ球菌の検出結果と義歯装着状態との関連分析
- II 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討

分担研究者 岸 光男 岩手医科大学 講師

研究要旨 舌苔を試料とした食品の機能評価のための in vitro 試験の可能性を検討するため 高齢者舌苔中のミュータンスレンサ球菌の Single step colony direct PCR 法による弁別検出と義歯装着状態との関連ならびに根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討を行った。その結果 舌苔はその付着状態の分布および微生物学的特性から 食品の有効性を評価するための指標または試料として有望であることが示唆された

A 研究目的

昨年度に引き続き 食品の機能性を細菌学的に検討するため 舌苔をサンプルとして直接培養法および Single step colony direct PCR 法の有用性を検討し 義歯装着状態との関連性を分析すること また 高齢者の歯根面う蝕と食品の関連を検討するための方法開発につき基礎的検討を行うことを目的とする。

B 研究方法

I 高齢者舌苔中ミュータンスレンサ球菌の検出結果と義歯装着状態との関

連分析

研究分担者らは昨年度 85 歳高齢者の舌苔を検討し 舌苔中歯周病原性細菌の検出率が無歯顎者で有意に低いことを示した。今年度さらに舌苔中のミュータンスレンサ球菌の検出を試み 義歯装着との関連を検討する

II 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討

ミュータンスレンサ球菌の義歯床用レジンへの付着量の評価方法を確立し 高齢者の歯根面齶蝕と食品の関連を検討するための方法開発のための基礎的検討を行う。

## C 研究結果

### I 高齢者舌苔中ミュータンスレンサ球菌の検出結果と義歯装着状態との関連分析

舌苔試料からの *Streptococcus mutans* と *Streptococcus sobrinus* の弁別検出状況を分析した結果 *S. mutans* と *S. sobrinus* はそれぞれ全体の 51.8%、45.7% から検出され (N=164) た。さらに *S. sobrinus* の検出率は有床義歯装着者では 48.7% なのに対し、有床義歯被装着者では 14.3% と有床義歯の装着状況によって有意な差を呈した。

### II 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討

標準菌株とともに義歯床用レジン加工し Dentcult® SM の培地中で培養したところ、*S. mutans* のコロニーは義歯床用レジン片への付着が弱くコロニーカウントが困難であった。これに対し *S. sobrinus* のコロニーは義歯床用レジン片への付着が強固であり、床用レジンの表面研磨状態に依存した付着状況を呈した。すなわち *S. sobrinus* は研磨や表面処理により表面疎水性が高い場合に付着コロニー数が少なく、反対に研磨が粗造である場合や表面疎水処理をしていない場合には付着コロニー数が多かった。

## D 考察

高齢者の舌苔からの *S. sobrinus* の

検出率は以前我々が調査した 20 歳台成人のそれ (約 9%, 岸 他 2002) に比べて有意に高かった。とくに床義歯装着者での検出率が高く、義歯非装着者では 20 歳台と検出率に比べて有意な差は認めなかった。一方 義歯床用レジンへのミュータンスレンサ球菌の *in vitro* 付着実験では *S. sobrinus* の床用レジンへの付着力は *S. mutans* に比べてはるかに強かった。以上よりこれら 2 つの研究で得られた観察結果の整合性は高く 高齢者で残存歯があり 床義歯を装着している者については *S. sobrinus* の検出率か齲蝕リスクの指標として重要であることか考えられた。

## E 結論

口腔内細菌に及ぼす機能性食品の影響を細菌学的に検討するために 高齢者の舌苔から *S. mutans*、*S. sobrinus* の弁別検出を Single step colony direct PCR 法で行い その有用性が確認された。また 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討を行い ミュータンスレンサ球菌の義歯床用レジンへの付着量の評価方法を確立した。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

学会発表

1 Ayumi ANDO Mitsuo KISHI,  
Fumie AIZAWA and Masami  
YONEMITSU The validity of saliva  
tests for caries administration in  
adults 82<sup>nd</sup> General Session of the  
International Association for Dental  
Research, March 2004, Honolulu,  
USA,

2 T ARAI, A HAYASHIDA, K  
HOSHI A NAWASHIRO, M KISHI

S IMAI, N HANADA, and K  
KAMOI Relationship between Oral  
Malodor and Clinical States of  
Periodontal Disease 82<sup>nd</sup> General  
Session of the International  
Association for Dental Research,  
March 2004 Honolulu, USA

H 知的財産権の出願 登録状況  
なし

厚生科学研究補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

pH 微小電極内蔵法を補う簡便な食品酸産生評価法の検討とその評価

分担研究者 高橋 信博 （東北大学大学院歯学研究科 教授）  
研究協力者 尹 梅 （東北大学大学院歯学研究科 客員研究員）

研究要旨 これまでの予備的検討によって ヒト口腔pH微小電極内蔵法を補う簡便法として 採取したヒト歯垢を懸濁しそれに糖溶液等を加えpH低下を見る「ヒト歯垢懸濁法」の妥当性が示唆された。そこで本年度は「ヒト歯垢懸濁法」を特定保健用食品の検定に用いてその有用性を検討し さらに特定保健用食品検定における「酸産生測定」の位置付けとその将来のあり方について最終的な検討を行った。その結果 「ヒト歯垢懸濁法」を用いることで 各種糖や食品の酸産生を相対的に評価することか可能と考えられた。しかし ヒト歯垢の個人差の検討 ヒト歯垢の保存法の確立 唾液など実際の口腔内で歯垢pHに影響を与える因子の考慮、食品水抽出液のpH及び緩衝能など 検討事項は多々存在し 「電極内蔵法の欠点を完全に補いかつ簡便な食品酸産生検定法」の実現は容易ではないことか分かった。以上のことから「ヒト歯垢懸濁法」は電極内蔵法に置き換えることかできる方法ではなく 「簡便であることを主眼としたスクリーニング法」として電極内蔵法を補助する方法であると考えられた。また 特定保健用食品検定における「酸産生測定」は 特定保健用食品の検定（食品機能性の検定）を行う以前に「必要条件」として行うことか妥当であり そのためには 外部の専門検定機関での事前検定や 新たな検定基準の策定が必要であると考えられる。

A 研究目的

米国 San Antonio で 1986 年に開催された食品う蝕誘発性に関する会議 (Schachtele *et al* J Dent Res 65 1530-1531 1986) 平成 4~6 年度総合研究 A (食品および代用糖のう蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究

代表 山田正) さらには英国 London で 1999 年に開催された食品う蝕誘発性および酸蝕性に関する会議 (Curzon and Hefferren, Br Dent J, 191 41-46, 2001) のいずれでも 食品のう蝕誘発性能を評価する方法の一つとしてプラーク pH を測定することか推奨されている。これまでの検討で、「ヒト口腔内に微

小電極を設置し、そこにプラークを形成させ、*in vivo*で直接プラーク pH を測定できる“フラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）”か、フラーク pH 測定する方法として最も信頼性の高い方法の一つであることが確認された。

しかし、この方法は①被験者の確保が難しいこと、②被験者の負担が大きいこと、③測定者の負担が大きいこと、さらには④測定システムが高価であることなどの欠点を内在することから、①プラーク pH テレメトリー法の高コスト性を補う簡便法の開発、そして②プラーク pH テレメトリー法を効率的に行う専門の検定機関の設置等が必要であるとの結論に達した。

前年度の予備的検討によって、電極内蔵法を補完する方法として「ヒト歯垢懸濁法—採取したヒト歯垢を懸濁し、それに糖溶液や食品水溶液を加え pH 低下を見る方法」の妥当性が示唆されている。そこで本年度は「ヒト歯垢懸濁法」を実際に特定保健用食品の検定に用いてその有用性を検討し、さらに特定保健用食品検定における「酸産生測定」の位置付けとその将来のあり方について最終的な検討を行った。

## B 方法

### 1 ヒト歯垢を用いた酸産生能評価（糖溶液）

斎藤らが報告した「スクリーニング検定法」（平成 5 年度科学研究費補助金（総合研究 A 代表 山田 正）研究成果報告書 食品および代用糖のう蝕誘発性を

総合的に評価するための基礎的研究 86-89, 1995）を改変した。

#### (1) 歯垢の採取と歯垢懸濁液の調整

被験者は歯垢採取日前夜から歯磨きをせず、採取日の朝、歯磨きおよび朝食前に歯垢を採取し、水冷したリン酸緩衝液（20 mM リン酸カリウム、150 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 7.0）の入ったマイクロ遠心用チューブに入れる。

歯垢をホモジナイザーで懸濁後、緩衝液で 2 回洗浄後、同様の緩衝液に懸濁し、歯垢懸濁液とする。

#### (2) pH 低下測定

測定には、イオン感受性電界効果型トランジスタ電極を組み込んだ簡易 pH メータ（pHBOY-P2 新電元）を用いた。

35°C 恒温器内で、簡易 pH メータ測定部に歯垢懸濁液 15  $\mu$ l を滴下し、1 分後、糖溶液 15  $\mu$ l を加え緩やかに攪拌した（糖終濃度 5%、ラクトースのみ終濃度 4%）。糖溶液は、10%糖溶液（ラクトースのみ 8%）に 130 mM KCl、0.44 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM NaCl を含む。糖溶液添加から 1 分間隔で 20 分間、さらに 5 分毎に 30 分まで pH 変化を記録した。使用した糖は、グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、ラクトース、ソルビトール、キシリトールの 7 種であった。ネガティブコントロールとして脱イオン水を用いた。

なお、スクロースをホソタイプコントロールとし、全ての歯垢懸濁液はスクロースによって pH が 5.0 以下まで下げる糖代謝活性を持つことを確認している。また、歯垢懸濁液は採取後 8 時間以内に

使用した。

## 2 ヒト歯垢を用いた酸産生能評価（チューインガム抽出液）

### (1) 歯垢の採取と歯垢懸濁液の調整

1 (1)と同様。

### (2) チューインガム抽出液の調整

チューインガム 3 グラムを計量し、60℃の脱イオン水 22.5 ml を加え（チューインガム 1 g に対し脱イオン水 7.5 ml）乳鉢の中で 10 分間すりつぶしこの水抽出液をチューインガム抽出液とする。なお この過程での温度は 30～40℃に保たれることを確認している。

L社の X B G F の4種のチューインガムを用いた。チューインガム B G F の成分表示には各種糖アルコールに加え砂糖 ブドウ糖の標記があった。チューインガム X は特定保健用食品として認可を受けており 成分表示にはマルチトール、キンリトール アスハルテーム L-フェニルアラニン化合物は記載されているが砂糖などの発酵性糖質の記載はなかった。

### (3) pH 低下測定

測定には イオン感受性電界効果型トランジスタ電極を組み込んだ簡易 pH メータ (pHBOY-P2 新電元) を用いた。

35℃ 恒温器内で 簡易 pH メータ測定部に歯垢懸濁液 15  $\mu$ l を滴下し 1 分後 糖溶液 15  $\mu$ l あるいはチューインガム抽出液 15  $\mu$ l を加え緩やかに攪拌した。スクロースをホソティブコントロール 脱イオン水をネガティブコントロールと

した。その他の条件は 1 (2)と同様。

## C 研究結果

### 1 ヒト歯垢を用いた酸産生能評価（糖溶液）

歯垢懸濁液の pH 低下の一例を示す(図 1 左)。スクロースが最も pH 低下が大きく 次いで グルコース フルクトース ラクトース ガラクトースの順であった。また キンリトール ソルビトール 脱イオン水を加えた場合は、pH 低下はほとんど見られなかった。しかし 30 分間の測定では最低 pH まで至っていないこと さらにはスクロース クルコース フルクトースの結果に見られるように pH 低下曲線の比較は必ずしも簡単ではない。

高橋は pH を水素イオン濃度に換算することによって pH 曲線は水素イオン濃度増加直線となり、pH 低下の比較やその評価が容易になることを示している（東北大学歯学会雑誌 6 91-98, 1987）。そこで 歯垢懸濁液の pH 低下曲線を水素イオン濃度に換算したところ複数の糖の酸産生能を相対評価することか簡便になることが確認された（図 1 右）

### 2 ヒト歯垢を用いた酸産生能評価（チューインガム抽出液）

歯垢懸濁法によるチューインガム抽出液の pH 低下の一例を示す（図 2 左）。L社 B G F チューインガムはスクロースと同等の pH 低下を示した。これに対し L社 X チューインガムでは pH 低下はほとんど見られなかった。なお 図に

は示していないが脱イオン水ではpHが低下しないことを確認している。pHを水素イオン濃度に換算することによって、L社B G Fチューインガムの酸産生

はスクロースの相対値として読みとることが可能である(図2右)

図1 各種糖溶液

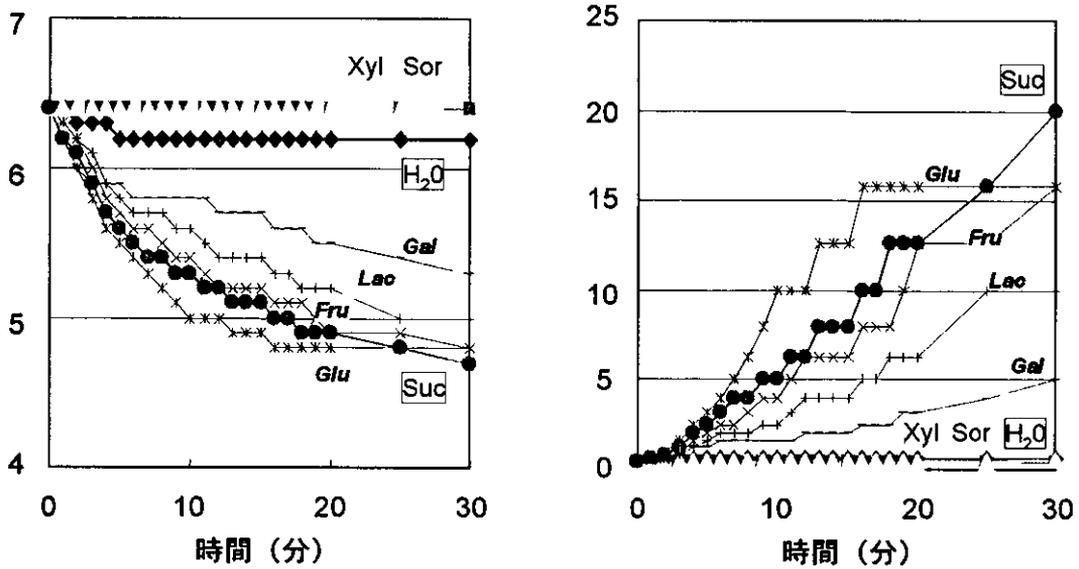
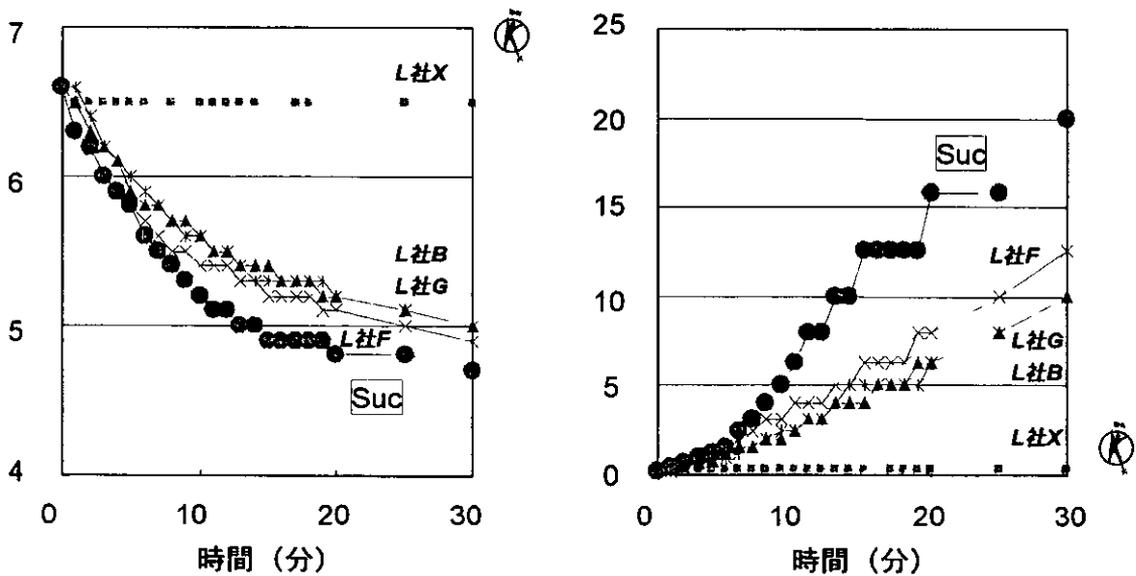


図2 チューインガム抽出液



## D 考察

ヒト歯垢を用いた歯垢懸濁法では、複数のヒトからの歯垢を混合することで個体差が平均化されること、さらに pH 低下曲線の水素イオン濃度増加直線に換算し、その勾配から酸産性能を比較、評価することによって、複数の糖を容易に相対評価できるものと考えられ、この方法は、現時点で妥当な方法の一つであると判断される。

実際、市販されているチューインガムの水抽出液を調整し pH 低下能を測定したところ、砂糖やブドウ糖という発酵性糖質を含有する表示を持つチューインガム抽出液では pH 低下が見られたことから、ヒト歯垢懸濁法は十分にチューインガムの酸産能を測定できることが分かる。一方、特定保健用食品の認定を受けているチューインガムでは全く pH 低下が見られないことから、ヒト歯垢懸濁法によってヒト歯垢 pH 微小電極内蔵法と同等の評価結果を得られることが期待できる。

しかし、ヒト歯垢の持つ個人差はまだ十分に検討されておらず、また、ヒト歯垢の保存法も必ずしも容易ではない。さらに、唾液など実際の口腔内で歯垢 pH に影響を与える因子の考慮など、この方法そのものを検討することが必要となろう。

また、今回はチューインガムの水抽出液を用いたが、実際の口腔内で歯垢中に入り込む場合と成分が同等ではないことが予測される。食品成分の濃度の違いはもちろんのこと、デンプンなどの食品含有成分が唾液アミラーゼによって分解さ

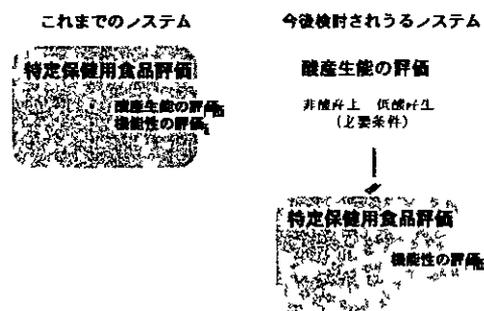
れ発酵性糖質を生ずる可能性の有無など、実際の口腔内とは大きく異なる条件での測定であることは留意すべきである。さらに、食品そのものか高い緩衝能を持つ場合、ヒト歯垢懸濁法では pH 低下を検知できないことも重要な留意点となろう。

ヒト歯垢懸濁法はヒト歯垢 pH 微小電極内蔵法と同様に、ヒト歯垢の酸産性能を見ているものであり、測定結果に高い相関があることが期待される。しかし、上述のような種々の要因から、ヒト歯垢 pH 電極内蔵法に置き換えることかできる方法とは言えず、「簡便であることを主眼としたスクリーニング法」として有効利用することが望ましいと考える。

\*

歯科における特定保健用食品は口腔疾患の予防、口腔の機能改善のための機能を有する食品であることから、口腔に含んだ場合にう蝕や酸蝕症の原因になるおそれか少ないことが最低基準として必要となる。すなわち、これまで歯科の特定保健用食品の検定で行ってきた「酸産生評価」は、本来、特定保健用食品の検定である機能性の検定を行う前に「必要条件」として行うことが妥当であると考え

図3 酸産生評価の特定保健用食品評価における位置づけ



られる (図3)。これまで 歯科における特定保健用食品はう蝕予防を主としていたため 酸産生評価がその大きな位置を占めていた。今後 う蝕に加え 歯周病 口臭症など広範な口腔疾患を対象とする場合には 酸産生評価は 特定保健用食品検定の前に独立して行うべき事項と思われる。さらには 歯科以外の特定保健用食品も口を経て摂取される以上 同様の理由から 口腔疾患の原因にならないことか最低限の条件であろう。特定保健用食品の検定の前段階の検定を広く効率的に行うためには 外部の専門検定機関 (国際トウースフレントリー協会等) や 新たな検定評価基準の策定が必須であると思われる。

#### E 結論

ヒト口腔 pH 微小電極内蔵法を補う簡便法として 妥当性が示唆されている「ヒト歯垢懸濁法」は 電極内蔵法に置き換えることかできる方法ではなく 「簡便であることを主眼としたスクリーニング法」として電極内蔵法を補助する方法であると考えられた。

#### F 健康危険情報 特になし

#### G 研究発表 (囲みは関連の強いもの)

##### 研究発表 (原著のみ)

- 1 Nobuhiro Takahashi  
Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and

*Fusobacterium nucleatum* Oral Microbiology and Immunology 18(2) 109-113, 2003

- 2 Takuichi Sato Junko Matsuyama Takashi Kumagai, Gen Mayanagi, Miyuki Yamaura Junpei Washio and Nobuhiro Takahashi Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque Letters in Applied Microbiology 37(1) 66-69, 2003
- 3 Takuichi Sato JingPing Hu Kousuke Ohki Miyuki Yamaura, Junpei Washio Junko Matsuyama and Nobuhiro Takahashi Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes Oral Microbiology and Immunology 18(5) 323-326, 2003
- 4 Shoko Takahashi-Abbe Kazuhiko Abbe and Nobuhiro Takahashi Biochemical and functional properties of pyruvate formate-lyase (PFL)-activating system in *Streptococcus mutans* Oral Microbiology and Immunology 18(5) 293-297, 2003
- 5 Harumi Miyasawa, Yoshimichi Iwami, Hideaki Mayanagi and Nobuhiro Takahashi Xylitol inhibition on anaerobic acid production by *Streptococcus*

*mutans* at various pH levels Oral Microbiology and Immunology 18(4) 215-219 2003

- 6 Junko Matsuyama, Takuichi Sato Etsuro Hoshino Tadashi Noda and Nobuhiro Takahashi Fermentation of five sucrose isomers by human dental plaque bacteria Caries Research 37(6) 410-415, 2003
- 7 Hatsue Kakuta, Yoshimichi Iwami, Hideaki Mayanagi and Nobuhiro Takahashi Xylitol inhibition on acid-production and growth of mutans streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions Caries Research 37(6) 404-409, 2003

#### 学会発表

- 1 多田浩之 菅原俊二 根本英二 今村隆寿 高橋信博、島内英俊 高田春比古 *Porphyromonas gingivalis* ブンジハインはヒト歯肉線維芽細胞 CD14 を分解して LPS 不応答性を誘導する 第76回日本細菌学会総会 (熊本市) 2003年4月2日 日本細菌学雑誌 58(1) 158, 2003
- 2 大木宏介 熊本裕行 佐藤拓一 高橋信博 一迫玲 大家清 歯原性角化嚢胞における PTC 遺伝子変異及び SHH ングナル伝達関連分子の検索 第57回日本口腔科学会総会 (福岡市) 2003年5月8日 第57回日本口腔科学会総会プログラム 抄録集 p 190 口科誌 52(6) in press, 2003
- 3 Hiroyuki Tada Shunji Sugawara

Eiji Nemoto, Nobuhiro Takahashi, Takahisa Imamura, Jan Potempa, James Travis, Hidetoshi Shimauchi and Haruhiko Takada Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by cysteine proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of neutrophil adhesion 第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月26日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-41 2003 (#0225) 【IADR Lion Awards 受賞】

- 4 Takuichi Sato, Miyuki Yamaura, Junko Matsuyama and Nobuhiro Takahashi Combination of genus-specific PCR and RFLP analysis for identification of oral streptococci 第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月26日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-80, 2003 (#0542)
- 5 Gen Mayanagi, Takuichi Sato Hidetoshi Shimauchi and Nobuhiro Takahashi Detection of 25 periodontopathic bacteria from periodontal sites by nested PCR 第81回 IADR (Goteborg Sweden) 2003年6月26日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-153, 2003 (#1128)
- 6 Mitsuru Shimonishi Juta Sato Nobuhiro Takahashi and Masashi Komatsu Expression of type IV collagen and laminin in the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament 第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月27日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-287, 2003 (#2212)
- 7 Junko Matsuyama Takuichi Sato

- Etsuro Hoshino, Tadashi Noda and Nobuhiro Takahashi  
Fermentation of five isomers of sucrose by dental plaque bacteria  
第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月28日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-360, 2003 (#2801)
- 8] Nobuhiro Takahashi, Takuichi Sato and Junko Matsuyama  
Metabolic pathway for palatinose of oral *Actinomyces* species 第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月28日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-360 2003 (#2802)
- 9] Kazuo Kato, Keiko Fukui, Haruo Nakagaki, Takuichi Sato and Nobuhiro Takahashi  
Distribution profiles of cariogenic streptococci within dental plaque treated with stannous fluoride gel The 50th Congress of the European Organization for Caries Research (ORCA) (Konstanz, Germany) 2003年7月3日 Caries Res 37(Special Issue) in press 2003
- 10] 佐藤拓一 高橋信博 口腔細菌叢の網羅的解析について 第18回口腔嫌気性菌研究会 (盛岡) 2003年9月17日 口腔嫌気性菌研究会プログラム集 18 6, 2003
- 11 佐藤廉也 佐藤拓一 高橋一郎 高橋信博 矯正用アンカープレート周囲溝内の細菌叢のプロファイリング 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 271 2003 (#029)
- 12] 佐藤拓一 山浦みゆき 松山順子、高橋信博 菌属特異的なPCRとRFLP解析による口腔レンサ球菌種の同定 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 271 2003 (#030)
- 13 大島勇人 佐藤拓一 監物新一 高橋信博 抗菌性薬剤に対するラット白歯感染歯髓の反応 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月19日 歯基礎誌45(5) 287, 2003 (#094)
- 14] 阿部昌子 阿部一彦、高橋信博 ミュータンスレンサ球菌乳酸脱水素酵素の活性調節に対する環境 pH の影響 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 325 2003 (#246)
- 15] 角田初恵 岩見憲道 真柳秀昭 高橋信博 キンリトールによる *Streptococcus mutans* 増殖抑制効果 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 326 2003 (#249)
- 16] 堀はるみ 堀克昌 真柳秀昭 岩見憲道 高橋信博 *Streptococcus mutans* 酸産生能のキンリトール感受性の多様性とその生化学的機構 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌45(5) 326, 2003 (#250)
- 17] 加藤一夫 福井敬子 中垣晴男 佐藤拓一 高橋信博 real-time 定量PCR を利用した歯垢内細菌の層別密度分布の分析 第52回口腔衛生学会 総会 (北九州) 2003年9月26日 口腔衛生学会誌 53(4) 340, 2003 (Abstract # 1E0940)
- 18 鷲尾純平 佐藤拓一 井川恭子 丹田奈緒子 岩倉政城 小関健由 高橋信博 口臭と舌苔中の総菌数および硫化水素産生菌数との関係 第52回口腔衛生学会 総会 (北九州) 2003年9月26日 口腔衛生学会誌 53(4) 344, 2003 (Abstract # 1E1040)
- 19] 五十嵐公英、浅沼慎 清水弘一 高橋信博 小児から高齢者に至る広範囲年齢層プラーク酸産生能のチェア-サイトでの評価 第52回口腔衛生学会 総会 (北九州) 2003年9月26

- 日 口腔衛生会誌 53(4) 381, 2003
- 20 Jumpei Washio, Takuichi Sato,  
Takeyoshi Koseki and Nobuhiro  
Takahashi Hydrogen sulfide-  
producing bacteria in tongue  
coating and oral malodor 第 82 回  
IADR (Honolulu Hawaii USA)  
2004 年 3 月 12 日 J Dent Res 83  
(Special Issue) in press 2004
- 21 Mitsuru Shimonishi Juta Sato,  
Nobuhiro Takahashi and Masashi  
Komatsu 第 82 回 IADR (Honolulu,  
Hawaii, USA) 2004 年 3 月 12 日 J  
Dent Res 83 (Special Issue) in  
press, 2004
- 22 Juta Sato Mitsuru Shimonishi,  
Nobuhiro Takahashi and Masashi  
Komatsu 第 82 回 IADR (Honolulu  
Hawaii, USA) 2004 年 3 月 12 日 J  
Dent Res 83 (Special Issue) in  
press, 2004

H 知的財産権の出願 登録状況 特に  
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

再石灰化機能の評価系の検討

- 1 人工プラーク下エナメル質に及ぼす食品成分効果の評価
- 2 再石灰化促進性食品の *in vitro* スクリーニング方法の検討

分担研究者 稲葉大輔 岩手医科大学歯学部予防歯科学講座 助教授

**研究要旨** 人工プラークに再石灰化促進食品素材であるリン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca) を作用させた場合に その直下にあるエナメル質の脱灰にどのような影響を及ぼすのかを人工口腔モデルにより検討した。また 食品成分の再石灰化促進性能をスクリーニングする *in vitro* 試験として 人工初期う蝕を形成したエナメル質を人工唾液 (1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, pH7) に7日間保管しつつ 毎日1時間 定時に被検成分 (乳製品) に浸漬処理する方法を検討した。その結果 人工プラークへの被検物質の供給は 主としてプラーク下にある歯質の脱灰抑制効果を判定することか可能であり また 人工唾液と食品の交互処理は 製品状態の食品の再石灰化促進性能の有無を簡便にスクリーニングできる可能性が示唆された。

A 研究目的

1 人工プラーク試験 リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca) はミュータンス連鎖球菌に代謝されず しかも人工プラーク内で高い緩衝能を発揮することが確認されている。また 歯質への効果を検討した *in vitro* 研究および口腔内実験の結果から この物質は唾液のミネラルバランス (Ca/P比) をヒドロキシアパタイトの値に近づけることにより環境を最適化し フッ化物の介在なしでも再石灰化を著しく促進することか確認されている。

これら唾液への作用に加え 本研究では 人工プラークに POs-Ca を作用させた場合に その直下にあるエナメル質の脱灰にどのような影響を及ぼすのかを人工口腔モデルにより検討した。

2 再石灰化能スクリーニング試験  
ある種の食品 とくにチーズなど乳製品はカルシウムを豊富に含み齲蝕の予防 治癒機転である歯質の再石灰化反応を促進することが知られている。しかし 乳製品の優れた効果を積極的に齲蝕の進行防御や予防に応用した試みは一部の臨床研究でしかみられない。

本研究ではこれら乳製品に着目し、それがエナメル質の再石灰化に及ぼす効果を *in vitro* で評価するシステムを検討した。

## B 試料と方法

### 1 人工プラーク試験

人工プラークは *S. mutans* MT8148 株の 18 時間培養液と 5%ショ糖液を毎分 0.1 ml の速度で牛歯エナメル質に 5 日間 37°C にて滴下することにより形成した。この結果、エナメル質表面には人工う蝕が形成された。ついて 0.1%POs-Ca を含む または含まない 3.7% BHI 添加ミネラル溶液 (1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, pH7) を 37°C にて人工プラークに供給した (n=6/群)。

### 2 再石灰化能スクリーニング試験

牛歯切歯歯冠部から約 7×5×5mm のエナメル質ブロックを作成した。1 群 6 試料として常温重合レジン (unifast-Trad, GC) に包埋し、全体を約 45×15×3mm のプレートに整えた。800 番の耐水ヘーハーで表面を研磨して新鮮エナメル質を露出させて実験歯面とした。0.1M 乳酸ケル (6wt% カルホキシメチルセルロース pH4.5) に 2 週間浸漬して、実験歯面に人工初期齲蝕 (脱灰深度  $ld = 105 \pm 16 \mu m$ ,  $\Delta Z = 3742 \pm 691 vol\% \mu m$ ) を形成した。ついて、次の 5 群に分け、B、C、D 群は人工唾液 (1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM HEPES, pH

7) に 7 日間浸漬し、その間、チーズ 10%懸濁液、チーズ 30%懸濁液、ミルクに 37°C で 1 日 1 回、60 分間浸漬した。A 群は未処理 (脱灰のみ)、E 群は比較のために設定し、2 ppmF-含有人工唾液に 7 日間、連続的に浸漬した。

- A 未処理 (脱灰のみ)
- B プロセスチーズ 10%懸濁液
- C プロセスチーズ 30%懸濁液
- D ミルク
- E 2 ppmF-含有人工唾液浸漬

### 3 ミネラル評価

実験終了後、歯質試料より厚さ約 200  $\mu m$  の平行切片を作製してマイクロラジオグラフィを撮影し、Inaba らの方法によりミネラル濃度分布を定量評価した。パラメータとしてう蝕病巣深度  $ld$  とミネラル喪失量  $\Delta Z$  を計測した (図 1)。

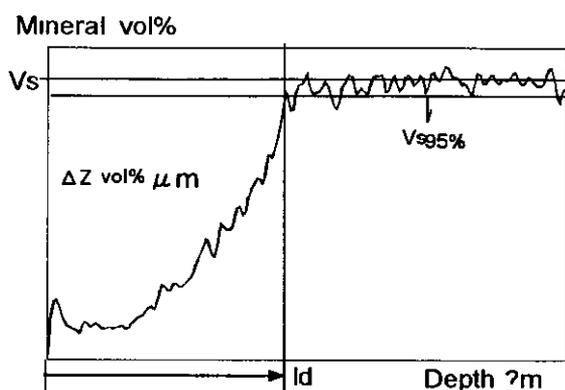


図1 ミネラル濃度曲線の模式図と計測パラメータ

$V_s$  = mineral vol% level of sound tissue

$l_d$  = the lesion depth ( $\mu\text{m}$ ) defined as the distance from the outer surface position to the location in the lesion at which the mineral content reaches to the 95% level of mineral content in sound tissue ( $V_{s95\%}$ )

$\Delta Z$  = integrated mineral loss value in vol%  $\mu\text{m}$

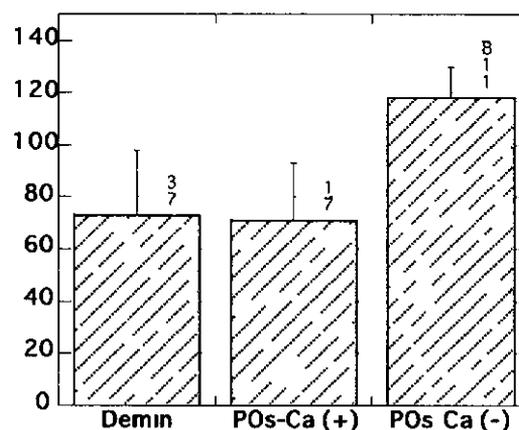
## C 研究結果

### 1 人工プラーク試験

結果を図2に示す。プラーク形成直後 ( $l_d = 73 \pm 25 \mu\text{m}$ ,  $\Delta Z = 2,513 \pm 886 \text{ vol}\% \mu\text{m}$ )に比較して POs-Ca 未処理群は有意に高いハラメータ値 ( $l_d = 118 \pm 12 \mu\text{m}$ ,  $\Delta Z = 4,400 \pm 800 \text{ vol}\% \mu\text{m}$ )を示した。すなわち明らかに脱灰が進行したことが確認された。一方 POs-Ca 作用群 ( $l_d = 71 \pm 22 \mu\text{m}$ ,  $\Delta Z = 2,400 \pm 960 \text{ vol}\% \mu\text{m}$ )ではプラーク形成直後とほぼ同等

の値を示しており 脱灰が進行しなかったことが確認された。この効果は、POs-Ca の高い緩衝能によりプラーク pHの低下が抑制されるとともに 再石灰化促進効果により プラークによる脱灰中にミネラルの回復が同時に発現したふたつの可能性が考えられる。今後 プラーク pHのモニタリングとプラーク中成分の分析などの追加が必要と考えられる。

Lesion depth  $\mu\text{m}$



Mineral loss value vol%  $\mu\text{m}$

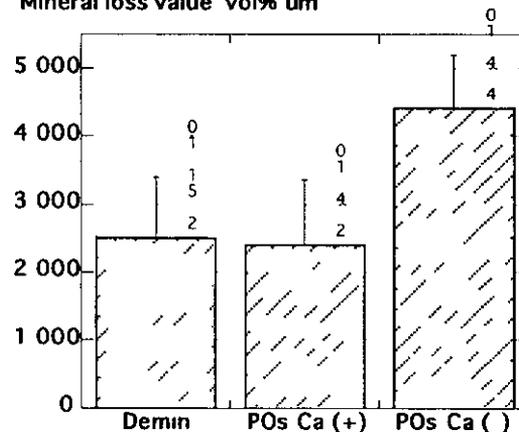


図2 人工プラーク試験後のミネラル計測値

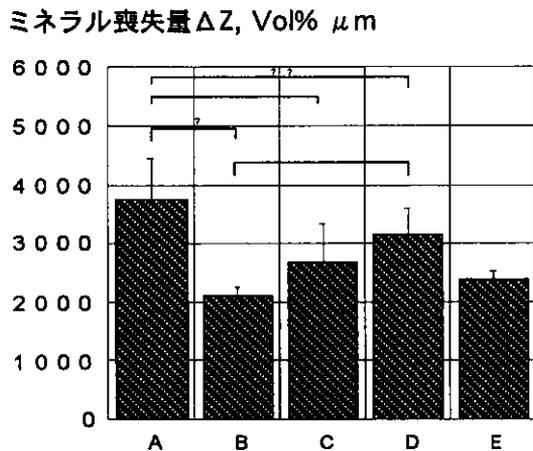
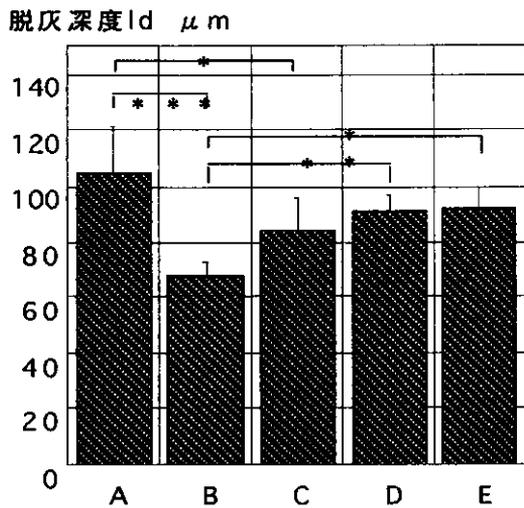


図3 食品スクリーニング試験後のミネラル計測

## 2 食品スクリーニング試験

結果を図3に示す A群(未処理)では脱灰深度  $ld = 105 \pm 16 \mu m$ ,  $\Delta Z = 3742 \pm 691 \text{vol}\% \mu m$  であったのに対し B群(10%チーズ懸濁液)は  $ld = 68 \pm 5 \mu m$ ,  $\Delta Z = 2114 \pm 129 \text{vol}\% \mu m$  と有意に再石灰化していた ( $p < 0.001$ )。C群(30%チーズ懸濁液)もA群に比較して再石灰化傾向を認め

たか B群よりも再石灰化の程度は弱かった ( $p < 0.05$ )。

30%チーズ懸濁液では試料にチーズの固形分が付着し、歯質内にミネラルイオンが効率よく到達できなかったためと考えられた。D群(ミルク)は10%チーズ懸濁液ほどの有意な再石灰化はみられなかったか、若干のミネラルの回復を認めた。以上の結果から本システムは食品の再石灰化促進効果の評価に応用でき、チーズには低濃度フッ化物に匹敵する再石灰化促進能があることが示唆された。

## D 考察

食品の再石灰化促進能あるいは脱灰抑制能を評価する反応システムとしては 次のような分類が考えられる。

### in vitro システム

- 化学的人工口腔 (試薬使用)
- 生物学的人工口腔 (微生物使用)

### 中間型システム

- ヒト唾液浸漬試験 (HSIテスト)

### in situ システム

- 歯質接着法 (歯質試料を直接歯面に接着)
- 口腔内装置法 (装置に歯質試料を接着)

このうち in situ システムは ヒト口腔で起こる変化を評価する点で、妥当性が高い。しかし 多大な労力と時間を要するうえ しかも不特定の因子の関与を受けることから 再現性や精度